

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年10月6日 (06.10.2005)

PCT

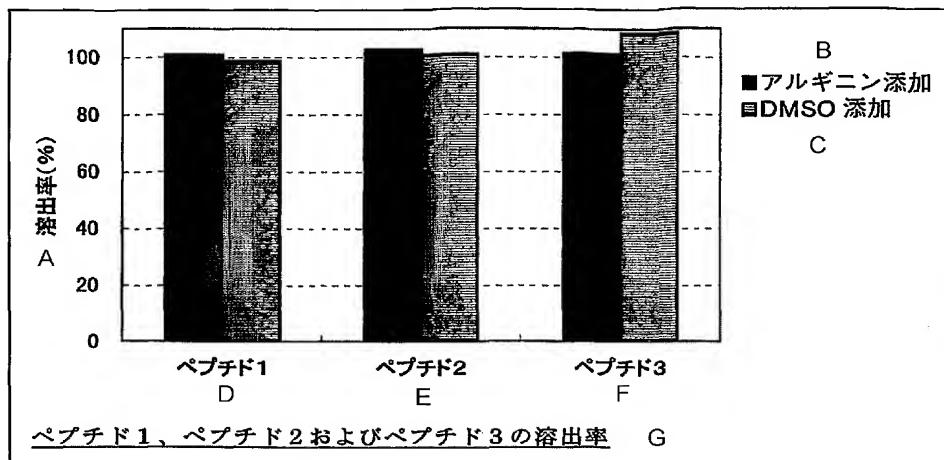
(10) 国際公開番号
WO 2005/092396 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 51/00, 49/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005182
- (22) 国際出願日: 2005年3月23日 (23.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-089620 2004年3月25日 (25.03.2004) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本メジフィジックス株式会社 (NIHON MEDI-PHYSICS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6620918 兵庫県西宮市六湛寺町9番8号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 川口 敬義 (KAWAGUCHI, Takayoshi) [JP/JP]; 〒2990266 千葉県袖ヶ浦市北袖3番地1 日本メジフィジックス株式会社内 Chiba (JP). 関 育也 (SEKI, Ikuya) [JP/JP]; 〒2990266 千葉県袖ヶ浦市北袖3番地1 日本メジフィジックス株式会社内 Chiba (JP). 前村 万里野 (MAEMURA, Marino) [JP/JP]; 〒2990266 千葉県袖ヶ浦市北袖3番地1 日本メジフィジックス株式会社内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FOR MEDICAL USE HAVING IMPROVED WATER-SOLUBILITY OF PEPTIDE AND METAL-LABELING EFFICIENCY AND PREPARATION FOR MEDICAL USE COMPRISING METAL-LABELED PEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチドの水溶性及び金属標識効率を改善した医療用組成物及び該ペプチドが金属標識された医療用製剤



A...ELUTION RATIO (%)

D...PEPTIDE 1

B...ARGININE ADDED

E...PEPTIDE 2

C...DMSO ADDED

F...PEPTIDE 3

G...ELUTION RATIOS OF PEPTIDES 1, 2 AND 3

(57) Abstract: By preliminarily dissolving a basic organic compound in an aqueous solvent in which a peptide usable in metal-labeling is to be dissolved, the solubility of the peptide is improved and thus metal-labeling can be carried out without heating. A composition for medical use containing a peptide usable in metal-labeling and a basic organic compound acceptable as a pharmaceutical additive can be utilized as a preparation useful in image diagnosis, radiotherapy and so on.

[続葉有]

WO 2005/092396 A1



(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき國際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 金属標識可能なペプチドを溶解させる水系溶媒に予め塩基性有機化合物を溶解させておくことによって、ペプチドの溶解性が向上し、非加熱で金属標識が可能となる。金属標識可能なペプチド及び医薬品添加物として許容され得る塩基性有機化合物を含有する医療用組成物は、画像診断あるいは放射性治療等に有用な製剤として利用することができる。

明 細 書

ペプチドの水溶性及び金属標識効率を改善した医療用組成物及び該ペプチドが金属標識された医療用製剤

技術分野

[0001] 本発明は、金属標識可能なペプチドの水溶性及び金属標識効率が改善された、金属標識可能なペプチドを含有する医療用組成物、金属標識された該ペプチドを含有する医療用製剤、並びに該ペプチドの金属標識方法に関する。更に詳しくは、水系溶媒に不溶もしくは難溶な金属標識可能なペプチドと共に塩基性有機化合物を水系溶媒に溶解させて得られる医療用組成物であつて室温下での該ペプチドの金属標識効率を向上させることが可能となる医療用組成物、該医療用組成物における該ペプチドを金属により標識することにより得られる医療用製剤、並びに該ペプチドの金属標識方法に関する。

背景技術

[0002] 分子内に金属標識可能な基を有するペプチドは、放射性金属や常磁性金属等で標識することにより、診断剤または治療剤の有効成分として用いることができる。

従来、金属標識可能なペプチドは、そのペプチド構造内にアルキル基などの疎水部分が多い分子ほど水系溶媒への溶解性が低く、そのようなペプチドを水系溶媒に溶解するには、ジメチルスルホオキシド(DMSO)やジメチルホルムアミド(DMF)などの有機溶媒に予め溶解させておき、必要とする量の水、あるいは緩衝液、またあるいは何らかの水溶液と混合する手法が用いられる。例えば、ペプチドの一つであるホルミル-Met-Leu-Phe(FMLP)は中性の緩衝液に難溶であることが知られている。この化合物を金属標識可能とした化合物ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ヒドラジノニコチン酸(fMLFK-HYNIC)を水系溶媒に溶解するためには、DMSOを用いて溶解した後、必要な緩衝液あるいは水系溶媒を加える必要がある(非特許文献1参照)。

しかしながら、上記方法で溶解させる場合、水系溶媒と混合したときに溶解可能な有機溶媒の溶液に占める割合が減少し、ある一定の有機溶媒濃度を下回ると、白濁

や析出などペプチドの不溶化が起こる場合があった。

[0003] 前記した如く金属標識可能なペプチドは、放射性金属で標識を行うことにより、核医学製剤として使用することができるが、DMSO等の有機溶媒を用いて該ペプチドを溶解させる既往の応用例では、その標識に100°C、10分以上の加熱反応条件、あるいは室温30分以上の反応条件が必要とされている。

例えば、fMLFK-HYNICは、室温30分～60分の反応条件が必要とされている（非特許文献1参照）。

FMLPの誘導体であるペプチド群は炎症などの白血球浸潤を伴う疾患の画像化に有用とされるが、完全な水系溶媒でかつ金属標識が室温で可能な条件については明らかではない（非特許文献2参照）。

[0004] 非特許文献1:van der Laken, CJ. et al., J. Nucl. Med., 38, 8, 1310-1315(1997)

非特許文献2:Verbeke, K. et al., Nuclear Medicine & Biology, 27卷, 769-779(2000)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、水に不溶もしくは難溶なペプチドを水系溶媒に溶解させやすくし、かつ非加熱で金属標識が可能な該ペプチドを含有する医療用組成物、金属標識された該ペプチドを含有する医療用製剤、並びに該ペプチドの金属標識法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、こうした課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、従来の知見からすれば驚くべきことに、塩基性有機化合物にペプチドを添加することにより、有機溶媒や界面活性剤を用いずに該ペプチドを室温で容易に水溶液とすことができ、かつ非加熱で金属標識が可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] 即ち、本発明は、金属標識可能なペプチド及び医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物を含有することを特徴とする医療用組成物に関する。

更に本発明は、上記医療用組成物を凍結乾燥することによって得られることを特徴

とする凍結乾燥した医療用組成物に関する。

更に本発明は、上記医療用組成物における金属標識可能なペプチドを金属で標識することにより得られることを特徴とする医療用製剤に関する。

更に本発明は、金属標識可能なペプチドに金属を標識する方法であって、該ペプチドを塩基性有機化合物の水系溶媒に溶解させた後、金属を標識することを特徴とする金属標識方法に関する。

更に本発明は、上記金属標識方法を用いることを特徴とする、金属標識されたペプチドを含有する医療用製剤の製造方法に関する。

発明の効果

[0008] 本発明に係る医療用組成物を用いることにより、水系溶媒に不溶もしくは難溶である金属標識可能なペプチドの溶解性が向上し、更に加温することなく該ペプチドを金属標識することが可能となった。本発明に係る金属標識方法を用いることにより、該ペプチドに非加熱条件下で金属を標識させることができた。更に、本発明に係る医療用組成物における該ペプチドを金属で標識した製剤は、例えば、ペプチドとして炎症のイメージングに用いることのできるペプチドを用いた場合には、ペプチドの炎症への集積率が、従来法により調製した組成物と比較して向上するという効果も奏していた。本発明により、例えば、ペプチドとして白血球結合性化合物を用いた場合には、個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行うPET画像診断、SPECT画像診断、MRI画像診断あるいは放射線治療等に有用な医療用組成物及び医療用製剤、並びにその標識方法を提供することが可能となった。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]ペプチド1、ペプチド2、及びペプチド3の溶出率を示す図。

[図2]pH9における各種添加剤添加によるペプチド1の溶出率の比較を示す図。

[図3]ジメチルホルムアミド(DMF)を用いて加熱標識したTc99m標識ペプチド1のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す図。

[図4]アルギニンを用いて非加熱標識したTc99m標識ペプチド1のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す図。

[図5]異なる標識法で標識したTc99m標識ペプチド1のウサギ感染症モデルにおけ

る炎症集積(%投与量/K pixel)を示す図。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] 以下、本発明の実施の形態について説明する。本明細書で用いるアミノ酸は全て一文字記号もしくは三文字記号で記し、特に断りのない限り左側をN末端側、右側をC末端側として表記した。アミノ酸に続くかつて内は、特に断りのない限り側鎖に結合したペプチドならびに有機化合物を表すものである。また、かつて内のアミノ酸配列は全体構造を把握しやすくするために、右側をN末端側、左側をC末端側として表記した。さらに、本明細書において、D体のアミノ酸はD-アミノ酸と記載した。
- [0011] 本発明に係る医療用組成物は、具体的には、水系溶媒に不溶あるいは難溶である金属標識可能なペプチドと、医薬品添加物として許容され得る塩基性有機化合物を必須成分として、これらを水系溶媒に溶解することにより調製される。
- 塩基性有機化合物としては、例えば、塩基性アミノ酸やイミダゾール環を有する塩基性化合物が挙げられる。塩基性アミノ酸としては特に限定されないが、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、ヒドロキシリジンなどが挙げられ、好ましくはアルギニン、リジン、ヒスチジン、より好ましくはアルギニンを使用する。イミダゾール環を有する塩基性化合物としては特に限定されないが、イミダゾールを例示することができる。塩基性アミノ酸あるいはイミダゾール環を有する塩基性化合物は1種を単独で用いることもできるが、2種以上を組み合わせて使用してもよい。
- [0012] 塩基性有機化合物を金属標識可能なペプチドと共に水系溶媒に溶解する場合、塩基性有機化合物の医療用組成物における濃度は、組成物中0.1mMから1Mの範囲となるように配合するのが好ましい。0.1mMよりも濃度が薄い場合、標識促進効果が得られないため好ましくなく、1Mよりも濃度が濃い場合、浸透圧毒性が問題となるため好ましくない。また、塩基性有機化合物の量は、使用するペプチドの種類などによって変動するが、通常、金属標識可能なペプチドに対して、モル濃度にして10倍から100万倍の範囲で用いるのが好ましく、1000倍から10万倍の範囲がより好ましい。金属標識可能なペプチドに対して10倍以下のモル濃度では、塩基性有機化合物による十分な溶解促進効果および標識促進効果が得られないため好ましくなく、100万倍以上のモル濃度では、該塩基性有機化合物が過剰量存在したことによ

る、標識への阻害作用があるため好ましくない。

上記濃度範囲において、組成物として好ましい溶液のpHは8～12であり、より好ましくはpH8.5～12である。pHが8より酸性の場合、塩基性有機化合物による溶解促進効果が損なわれるため好ましくなく、pH12よりもアルカリ性の場合、生体へ悪影響を与える恐れがあるため好ましくない。

[0013] 本発明で用いる金属標識可能なペプチドは、具体的には、水系溶媒に不溶もしくは難溶なペプチドであり、診断薬もしくは治療用医薬品の有効成分として利用可能なペプチドであることが好ましく、アミノ酸30残基以下又は分子量4500以下であるポリアミノ酸化合物がより好ましい。その構造中にアミノ基及びカルボニル基を含んでいてもよい。該ペプチドは、金属標識が可能である限り特に限定はされないが、炎症等の診断に用いる場合には、例えば白血球結合性化合物を用いることができる。

[0014] 本発明に用いるペプチドとしては、下記式(1)

(化1)



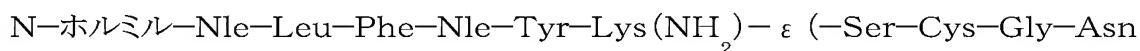
で表される化合物が好適に用いられる。ここで、化学式(1)は、白血球のホルミルペプチド受容体との結合部位Z-Y-Leu-Phe-、全白血球中の単球、リンパ球への結合率を向上させる結合部分-(R)o-、放射性金属、常磁性金属を標識可能な構造-U-、およびこれらを結合するスペーサー-(X)_n-、-Lys(NH₂)_m-および-(T)l-よりなっている。

化学式(1)中、Zはアミノ基の保護基を表し、YはMetまたはNleを表し、(X)_nにおいて、Xは1個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、nは1または0を表し、(NH₂)_mにおいて、NH₂はLysのα位のカルボキシル基の保護基としてのアミド基、mは1または0を表し、ε(-(R)o-(T)l-U)において、RはLysのε-アミノ基にアミド結合したSerまたはThr、oは1または0、Tは1個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、lは1または0、Uは金属標識可能な基を表す。但し、XとTは同じでも異なっていてもよい。

[0015] 化学式(1)中、Uについては、金属標識が可能である限り特に限定されないが、好ましくは、複数のアミノ酸より成る配位子、より具体的には、金属標識可能なトリペプチ

ド、ジペプチドメルカプトアシレート、炭素数8から20の窒素含有環状化合物、炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物、炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体、炭素数4から10のアルキレンアミンカルボン酸などが挙げられる。より具体的には、例えば、-Cys-Gly-Asp、-Cys-Asp-Asp、-Cys-Asp-Gly、-Cys-Gly-Glu、-Cys-Glu-Glu、-Cys-Glu-Gly、-Cys-Gly-Asn、-Cys-Asn-Asn、-Cys-Asn-Gly、-Cys-Gly-Gln、-Cys-Gln-Gln、-Cys-Gln-Gly、-Cys-Gly-Lys、-Cys-Lys-Lys、-Cys-Lys-Gly、-Cys-Gly-Arg、-Cys-Arg-Arg、-Cys-Arg-Glyなどの金属標識可能なトリペプチド;-Asp-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Gly-メルカプトアセチルなどのジペプチドメルカプトアシレート;1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン(Cyclen)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン(Cyclam)、1, 4, 8, 12-テトラアザシクロヘンタデカン、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン(Dioxocycam)などの炭素数8から20の窒素含有環状化合物;1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸(TETA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸(DOTA)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸、1, 4, 8, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸などの炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物;1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-アミノエチルカルバモイルメチル-4, 7, 10-トリス[R, S]-メチル酢酸(DO3MA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10- α , α' , α'' , α''' -テトラメチル酢酸(DOTMA)などの炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体;エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ジェチレントリアミンペニタ酢酸(DTPA)、トリエチレンテラミンヘキサ酢酸、エチレングリコール-(2-アミノエチル)-N, N, N', N'-テトラ酢酸(EGTA)などの炭素数4から10のアルキレンアミンカルボン酸などから選択される金属標識可能な基を用いることができる。

[0016] 化学式(1)で表される具体的な化合物としては、化学式(1)中、Zがホルミル基であるものが好ましく、例えば、



)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-Cys-Gly-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys-ε(-Ser-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-e(-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペプチド酸(DTPA))、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-ジエチレントリアミンペプチド酸(DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Asp-Asp-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Gly-Asp-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Gly-Gly-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Asp-Gly-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-ジエチレントリアミンペプチド酸(DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ヒドラジノニコチン酸

などが挙げられる。

[0017] 更に好ましくは、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-Cys-Gly-Asn)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-Cys-Gly-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys-ε(-Ser-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-e(-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペプチド酸(DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Asp-Asp-メルカプトアセチル)、
N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Gly-Asp-メルカプトアセチル)、
N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Gly-Gly-メルカプトアセチル)
などが挙げられる。

化学式(1)に記載の化合物を本発明に用いる場合には、金属標識可能な基を、適当な保護基で保護したものを用いることもできる。

[0018] 上記した白血球結合性化合物などの金属標識可能なペプチドは、以下に説明する方法により合成することができる。

(1)全てアミノ酸から構成される場合は、アプライドバイオシステムズ社製ペプチド自動合成機等の汎用的に使用されているペプチド自動合成装置によりBoc法、あるいはFmoc法等により合成することができる。合成された複合体は、固相用樹脂担体に結合した状態から脱保護基と樹脂担体切り放しを同時にを行い、その後、逆相系カラム等を用いた高速液体クロマトグラフ法(以下、HPLC法という)にて精製することができる。その他、ペプチド液相合成法により調製してもよく、また、動物等から採取してもよい。

[0019] (2)非アミノ酸化合物を含んでいる場合は、その多くの場合、上記した同様の方法によって合成できる。例えば、固相用樹脂担体にLys残基またはその保護誘導体を結合させ、そのN末端にXのアミノ酸残基またはその保護誘導体、あるいはスペーサーとしての機能を有する化合物またはその保護誘導体、Pheまたはその保護誘導体、Leuまたはその保護誘導体、Yのアミノ酸またはその保護誘導体を順次結合させ、続いて固相用樹脂担体に結合したLysの側鎖である ϵ アミノ基を活性化させて、RのSerあるいはThrまたはその保護誘導体を結合させ、それにスペーサーTのアミノ酸またはその保護誘導体、あるいはスペーサーとしての機能を有する化合物またはその保護誘導体、次いで、Uの金属標識可能な基となり得る化合物またはその保護誘導体を結合させ、その後に樹脂担体から合成された目的とする上記式(1)の合成物を切り放すことによって合成できる。

他の金属標識可能なペプチドも上記方法を採用することにより容易に合成することができます。

[0020] 本発明の医療用組成物における金属標識可能なペプチドの使用量は、通常、目的とする診断および治療に好ましいとされる範囲で使用することができる。この範囲は安全性において許容されうる範囲の量であることが望ましく、加えて受容体に作用するペプチドを用いる場合は、目的とする受容体と同等か、少ない量で用いることが望ましい。より具体的なペプチドの使用量は、好ましくは0. 1nMから10 μ Mの濃度の範囲である。

[0021] 本発明の医療用組成物は、上記した金属標識可能なペプチドを、塩基性有機化合物と共に、水系溶媒、具体的には、滅菌水に必要に応じて、他の有機溶媒などを添加した溶媒に、溶解することにより調製される。必要に応じて所望とする添加剤をさらに加えることができる。添加剤としては、例えば、界面活性剤、親水性有機溶媒、還元剤、pH調整剤、安定化剤などを挙げることができる。

[0022] 界面活性剤としては特に限定はされないが、例えば、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール300、ポリエチレングリコール600、ポリエチレングリコール1000およびポリエチレングリコール1540などの非イオン性界面活性剤を挙げることができ、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートを使用するのが好ましい。界面活性剤の添加量は、好ましくは医療用組成物中0. 01ー1重量%であり、より好ましくは0. 05ー0. 5重量%である。

親水性有機溶媒としては特に限定されないが、例えば、エタノール、プロパンノール、ブタノール、アセトニトリル、アセトン、メチルエチルケトンなどの極性有機溶媒を挙げができる。親水性有機溶媒の添加量は、好ましくは医療用組成物中0. 1ー10重量%であり、より好ましくは0. 2ー1重量%である。

還元剤は、標識される金属が酸化されるのを防ぐために添加される。還元剤としては特に限定されないが、例えば、塩化第一スズ、アスコルビン酸、水素化ホウ素ナトリウムなどを挙げができる。還元剤を添加する際の濃度は、医療用組成物中0. 01mMー10mMとなるように添加することが好ましく、さらに好ましくは、0. 05mMー1

mMの範囲で添加する。

pH調整剤としては特に限定されないが、例えば、塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸(以下、「TFA」とする)、クエン酸、リン酸、アスコルビン酸、水酸化ナトリウム、アンモニアなどを挙げることができる。

安定化剤としては特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、p-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸ナトリウム、ゲンチシン酸、ゲンチシン酸ナトリウムなどを挙げることができる。安定化剤を添加する際の濃度は、組成物中0.1mM～1Mとなるように添加するが好ましく、さらに好ましくは、5mM～500mMの範囲で添加する。

[0023] 本発明に係る医療用組成物は、水系溶媒に金属標識可能なペプチドと塩基性有機化合物が溶解した水系溶液の形態で用いることもでき、また、水系溶液の形態にある医療用組成物を凍結乾燥して、凍結乾燥の形態とすることもできる。凍結乾燥することにより、キットやその他の形態の診断薬や治療用医薬品として用いることが容易に可能となり、注射剤の最終原料としても容易に用いることができる。凍結乾燥する場合には、水系溶媒に金属標識可能なペプチドと塩基性有機化合物が溶解した水系溶液の形態で用いる医療用組成物を、通常の方法により凍結乾燥することができる。

水系溶液の形態あるいは凍結乾燥した形態にある本発明の医療用組成物は、金属などを含む標識用試薬などと共に、診断薬あるいは治療用医薬品として、供することができる。

[0024] 本発明の医療用組成物における金属標識可能なペプチドは、効率良く金属で標識することができ、金属で標識することにより調製された医療用製剤は、例えば、金属標識可能なペプチドとして、白血球結合性化合物などの炎症部位へのイメージングに利用できるペプチドを用いた場合には、ペプチドの作用により免疫反応を伴う炎症部位に集積し、標識された金属によって当該部位を画像化することができる。より具体的には、本発明に係る医療用製剤を放射性診断剤並びにMRI造影剤として用いることにより、かかる炎症部位を画像化することが可能である。また、本発明は画像化のみならず、適切な放射性金属を選択することにより、放射性治療剤として用いる

ことができる。

[0025] 放射性診断剤として用いる場合には、本発明の医療組成物中の金属標識ペプチドをTc-99m、In-111、Ga-67、Sn-117m、Sm-153、Re-186などのSPECT用放射性金属または、Cu-64、Ga-68などのPET用放射性金属で標識した放射性金属標識ペプチドとするのが好ましい。MRI造影剤として用いる場合には、該ペプチドにCu、Fe、Mn、Gd、Dyなどの常磁性金属を配位させた常磁性金属標識化ペプチドとするのが好ましい。放射性治療剤として用いる場合には、該ペプチドをY-90、Re-186またはRe-188などの放射性金属で標識した放射性金属標識ペプチドとするのが好ましい。

[0026] 該ペプチドを金属、例えば放射性金属又は常磁性金属で標識する方法としては、種々の方法を用いることができる。例えば、Tc-99m、Re-186およびRe-188で標識する場合は、本発明の医療用組成物中に塩化第一スズ等の安定量の医薬品添加物として許容されうる還元剤を加え、過テクネチウム酸ナトリウム溶液、または過レニウム酸ナトリウム溶液と混合する常套の方法により標識化合物を調製することができる。Cu、Cu-64、Fe、Mn、Gd、In-111、Sn-117m、Sm-153、Dyで標識する場合は、本発明に係る医療用組成物とCu、Cu-64、Fe、Mn、Gd、In-111、Sn-117m、Sm-153、Dyイオンを含む弱酸性水溶性溶液とを混合することで調製できる。この場合、最終pHが8以上となるようpHの調整をすることが望ましい。Ga-67、Ga-68またはY-90で標識する場合は、本発明に係る医療用組成物とGa-67、Ga-68またはY-90イオンを含む弱酸性ないし弱アルカリ性の水溶性溶液とを混合することにより行うことが可能である。この場合、最終pHが8以上となるようpHの調整をすることが望ましい。

金属で標識する際の条件としては、室温で5分～24時間、好ましくは5～60分、より好ましくは10～30分、攪拌や振倒する等の条件を用いることができる。

[0027] 放射性金属または常磁性金属で標識されたペプチドを含有する医療用製剤は、必要に応じて薬学的に許容される添加物を更に添加して、好ましい放射性診断剤、放射性治療剤とすることができる。かかる添加物としては、薬学的に許容されるアスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、p-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸ナトリウム、

ゲンチシン酸、ゲンチシン酸ナトリウム等の安定化剤、水性緩衝液等のpH調整剤、D-マンニトール等の賦形剤、および放射化学的純度を改良するのに役立つクエン酸、酒石酸、マロン酸、グルコン酸ナトリウム、グルコヘプトン酸ナトリウム等が挙げられる。

[0028] 放射性金属あるいは常磁性金属で標識したペプチドを含む本発明の医療用製剤を、放射性診断剤、放射性治療剤またはMRI造影剤として用いる場合は、静脈内投与等の一般的に用いられる非経口手段により投与でき、その投与量は患者の体重、年令、適当な放射線イメージング装置、MRI測定装置および対象疾患状態等の諸条件を考慮して決定される。

例えば、ヒトを対象とする場合、Tc-99m標識ペプチドを用いた診断剤の投与量は、Tc-99mの放射能量として37MBq～1110MBqの範囲であり、好ましくは185MBq～1110MBqである。Re-186またはRe-188標識ペプチドを用いた治療剤の場合は、放射能量として37MBq～18500MBqの範囲であり、好ましくは370MBq～7400MBqである。Y-90標識ペプチドを用いた治療剤の場合は、放射能量として37MBq～3700MBqの範囲であり、好ましくは37MBq～1110MBqの範囲である。他の放射性金属で標識した標識ペプチドの投与量もほぼ同様である。Gd、Fe、Mn、Cu、Dyなどの常磁性金属で標識した標識ペプチドを用いた診断剤の投与量は、MRI画像化装置の感度、標的組織、投与の特定の様式および使用の意図される効果に応じて適宜選択される。

例えば、ヒトに対して静脈内投与する場合であって、用いる金属がGdである場合は、通常は、体重当たり0.01～0.3mmol/kgの範囲の投与量が好ましく用いられる。

[0029] 以下、本発明の実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

実施例において得られた物質の測定方法、使用した試薬等を下記に示す。

(1) ガンマカウンター： 血液内分布は、オートウェルガンマカウンター(アロカ株式会社製)を用いて測定した。体内分布検討は、NaIシングルチャンネルアナライザー(応用光研工業株式会社製)を用いて測定した。

(2) ガンマカメラ：GMS-550U(東芝メディカル株式会社製)、またはMillennium

MG(GE横河メディカルシステム株式会社製)を用いて測定した。

(3)逆相HPLC:逆相カラムCosmosil 5C₁₈-AR-300(ナカライテスク株式会社製、4.6×150mm)を用いた。

(4)ペプチド化合物は全て、固相合成法により作製した。

(5)^{99m}TcO₄⁻:⁹⁹Mo/^{99m}Tcジェネレーター(商品名;メジテック、日本メジフィジックス株式会社製)を用い、生理食塩液にて溶出したものを用いた。

(6)試薬はすべて特級試薬以上の製品を用いた。

(7)すべての実験動物は実験に先立ち1週間12時間毎の明暗サイクル条件下で飼育した。その期間、餌および水は自由に摂取させた。

[0030] (8)本実施例に用いたペプチドは、次に記すペプチドを用いた。

ペプチド1:ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-e(-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)

ペプチド2:ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-e(-Ser-D-Arg-DTPA*)

ペプチド3:ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-e(-Gly-Asp-Ac-S-Bzl)

*:DTPA:ジエチレントリアミンペンタ酢酸

[0031] (9)ペプチド1の合成

ペプチド1を、固相合成法により製造し、以下の実施例に用いた。

アプライドバイオシステムズ社製ペプチド合成機(モデル430A)を用い、Boc法によりMBHA樹脂(p-Methoxy-Benzhydrylamine Resin

hydrochloride,1%Divinylbenzene-polystyrene copolymer)を用いて0.5mMスケールの条件で合成を行った。この際C末端、Lys残基の側鎖はFmoc基で保護した。ペプチド鎖を伸長、N末端アミノ基をホルミル化した後、Lys残基の側鎖Fmoc基を20%ピペリジン/DMFで切断し、側鎖側にペプチド鎖を伸長した。ペプチドの切出しへ、無水フッ化水素:p-クレゾール(80:20)中、-2°Cから-5°Cにおいて1.0時間反応させて行った。

合成したペプチドにつき、HPLC法(カラム:YMC-Pack ODS-A SH-365-5(商品名、株式会社ワイエムシイ製、30×250mm)、カラム温度:室温、溶出速度:2

0mL／分、検出器:紫外可視吸光光度計(吸収波長:220nm)、溶出液A:0. 1% TFA／精製水、溶出液B:0. 1% TFA／アセトニトリル、(A／B(80%／20%)→A／B(30%／70%)90分))を用いて主ピークを分取し、凍結乾燥した。得られたペプチドにつき、逆相HPLC(カラム:Zorbax300SB-C18(商品名、横河アナリティカルシステムズ株式会社製、4. 6×150mm)、カラム温度:50°C、流速:1. 0mL／分、検出器:紫外可視吸光光度計(吸収波長:220nm)、溶出液A:0. 1%TFA／精製水、溶出液B:0. 1% TFA／アセトニトリル(A／B(80%／20%)→A／B(30%／70%)25分))を用いて、分析を行った。その結果、得られたペプチドの純度は93. 2%(面積百分率)であった。

なお、MBHA樹脂のかわりにプレロードレジンを用いても同様に合成が可能であった。

[0032] 上記精製したペプチドにつき、6Mの塩酸内にて110°C、22時間の加水分解を行って各アミノ酸に分解した。L-8800形日立高速アミノ酸分析計(商品名、株式会社日立ハイテクノロジーズ製)を用い、以下の条件にてアミノ酸組成を求め、ペプチド1と同様のアミノ酸組成を有することを確認した。また、質量分析(以下、ESI-MS)を行い、ペプチド1の理論値と一致することを確認した。

アミノ酸組成分析条件

機種:L-8800形日立高速アミノ酸分析計

クロマト条件

カラムサイズ:4. 6mm I. D. ×60. 0mm

固定相:日立カスタムイオン交換樹脂 # 2622

移動相:クエン酸ナトリウム系緩衝液(4種類及び分析カラム再生用0. 2N-NaOH試液)の段階的溶出法

(1)L-8500-PH1:0. 16N, pH3. 3

(2)L-8500-PH2:0. 2N, pH3. 2

(3)L-8500-PH3:0. 2N, pH4. 0

(4)L-8500-PH4:1. 2N, pH4. 9

流速:0. 40mL／分

カラム温度:57°C

検出

試薬:(1)ニンヒドリン試液(2)ニンヒドリン用緩衝液(Ninhydrin Re agent L-8500 Set)

反応試薬流速:0. 35mL／分

反応装置:電子加熱反応カラム, 設定温度:135°C

検出波長:570nmおよび440nm

標準アミノ酸

試薬:味の素Amino Acid Calibration Mixture

濃度:各50nmol／mL (但しProは100nmol／mL)

希釈液:0. 2M Na Citrate Buffer(pH2. 2)

注入量:40 μL(各アミノ酸2nmol, Proは4nmol))

定量計算方法:面積値による1点絶対検量線法

以下に得られたペプチド1のアミノ酸組成の分析値(分子当たりの個数)及び質量分析の結果を示す。なお、丸かつこ内は、目的ペプチドのアミノ酸組成の理論値を示す。

[0033] ペプチド1=Asp:(3)3. 19、Ser:(1)0. 97、Tyr:(1)0. 97、Phe:(1)0. 98、Lys:(1)1. 00、NH₃:(1)1. 20、Leu(1)+Nle(2)2. 80、Arg:(1)1. 06、Cys:(1)0. 92

また、得られたペプチド1のESI-MSの分析値を示す。丸かつこ内は、目的ペプチドの分子量の理論値を示す。

ESI-MS:MW=514. 4(1514. 7)

実施例 1

[0034] アルギニンによるペプチドの溶解性

(1)方法

ペプチド1、ペプチド2及びペプチド3の各100 μgを410mMのアルギニン溶液(pH11)に加え、全量を700 μLとした。この時のモル濃度は、ペプチド1は94 μM、ペプチド2は99 μM、ペプチド3は161 μMとなる。外観観察により白濁の有無を確認

した後、各試料液から200 μLを孔径0.22 μmのフィルター、マイレクス(登録商標)－GV(商品名、日本ミリポア株式会社製)にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相HPLCにて分析し、フィルター前後のペプチドのピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。HPLC分析条件を下記に示す。

比較例として、水、ジメチルスルホオキシド(DMSO)それぞれに、ペプチド1、ペプチド2およびペプチド3を溶解させ、それぞれ94 μM、99 μM、161 μMのペプチド濃度とした試料について、同様に検討を行った。

HPLC条件

カラム:Cosmosil 5C₁₈ -AR-300(ナカライトスク株式会社製、4.6 × 150mm)

溶出速度:1mL/分

検出:紫外可視吸光光度計(検出波長:220nm)

HPLCシステム:Alliance(日本ウォーターズ株式会社製)

溶出液A:0.1%トリフルオロ酢酸(以下TFA)/精製水

溶出液B:0.1%TFA/アセトニトリル

濃度勾配:0分(溶出液B20%)→25分(溶出液B70%)

[0035] (2)結果

得られた結果を表1および図1に示す。各ペプチドを溶解後、外観を観察した結果、3種のペプチドは水では白濁がみられたのに対し、アルギニン水溶液では3種のペプチドの全てが無色透明な外観を示した。これはDMSOの試料溶液と同様な外観を示した。逆相HPLCを用いた溶出率においては、アルギニンおよびDMSOの各試料溶液のいずれもが、約100%の溶出率を示した。これらの結果より、DMSOと同様に、アルギニンはペプチドの溶解性を高めていることが確認された。

[0036] [表1]

各試料溶液の外観の観察結果及び溶出率

溶媒 ペプチド	外観			溶出率	
	水	アルギニン	DMSO	アルギニン	DMSO
ペプチド1	白濁	無色透明	無色透明	100.8%	98.6%
ペプチド2	白濁	無色透明	無色透明	102.8%	100.9%
ペプチド3	白濁	無色透明	無色透明	101.3%	108.5%

実施例 2

[0037] アルギニン、リジン及びヒスチジンによるペプチド1の各pHにおける溶解性

(1)方法

アルギニン、リジンおよびヒスチジンを水に溶解し、アルギニン溶液は410mM、リジン溶液は489mM、ヒスチジン溶液は90mMの濃度にて調製した。これらの溶液に水酸化ナトリウム水溶液および塩酸にて、リジンおよびヒスチジン水溶液はpH8、9、10、11に、アルギニン水溶液はpH8、8.5、9、9.5、10、11に調整した。続いてペプチド1をこれら水溶液に加えて94 μMの濃度にて調製し、外観観察により白濁の有無を確認した。各試料液から200 μLを孔径0.22 μmのフィルター、マイレクス(登録商標)-GV(商品名、日本ミリポア株式会社製)にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相HPLCにて分析し、フィルター前後のペプチド1のピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。HPLC分析条件は実施例1記載と同じ条件にて実施した。

[0038] (2)結果

得られた結果を表2に示す。アルギニン水溶液はpH8で明らかな白濁が認められた。アルギニン、リジン、及びヒスチジンの各水溶液ではpH8.5以下では弱い白濁が見られたが、リジン及びヒスチジン水溶液は、pH8においても20%強の溶出率が認められ、リジン及びヒスチジンは、pH8においてもペプチドを溶解させる効果があることが確認された。さらに、アルギニン、リジン、及びヒスチジン水溶液において、pH9以上では無色透明な溶液となり、ペプチドの溶出率も85%以上であった。従って、これらの塩基性アミノ酸は、pH8以上で、ペプチドの溶解性を奏し得ることが示された。

[0039] [表2]

アルギニン、リジン及びヒスチジンによるペプチド1の各pHにおける溶出率

	pH 8	pH 8.5	pH 9	pH 9.5	pH 10	pH 11
アルギニン	測定せず(*)	43.8%	93.8%	95.4%	98.8%	100.8%
リジン	21.0%	-	89.0%	-	83.6%	85.9%
ヒスチジン	26.8%	-	85.9%	-	90.7%	96.7%

* 外観観察にて明らかな白濁が認められたため、HPLC測定を行わなかった

実施例 3

[0040] イミダゾールによるペプチド1の各pHにおける溶解性

(1)方法

イミダゾールを水に溶解し、1mMの濃度にて調製した。この溶液に塩酸を適当量加えることにより、pH8、8.5、9に調整した。続いてペプチド1をこれらイミダゾール溶液に加えて94 μMの濃度にて調製し、外観観察により白濁の有無を確認した。各試料液から200 μLを孔径0.22 μmのフィルター、マイレクス(登録商標)-GV(商品名、日本ミリポア株式会社製)にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相HPLCにて分析し、フィルター前後のペプチド1のピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。HPLC分析条件は実施例1記載と同じ条件にて実施した。

[0041] (2)結果

得られた結果を表3に示す。pH8、8.5、9のいずれの溶液においても無色透明であり、またpH8.5、9以上では80%以上の溶出率を示した。よって、ペプチド1に対しイミダゾールは高い溶解性を示すことが確認された。

[0042] [表3]

イミダゾールによるペプチド1の各pHにおける外観の観察結果及び溶出率

	外観	溶出率
pH 8	無色透明	64.9 %
pH 8.5	無色透明	80.8 %
pH 9	無色透明	99.2 %

実施例4

[0043] 各種添加剤によるペプチド1の溶解性

(1)方法

リン酸水素二ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、イミダゾールを水に溶解し、pH9の各水溶液を表4に記載の濃度にて調製した。pH調整は塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を用いて実施した。秤量したペプチド1に前記の水溶液を加え、94 μMとし、外観観察により白濁の有無を確認した。また同様に、実施例2で得られた、アルギニン、リジンおよびヒスチジン水溶液に溶解されたペプチ

D1水溶液についても白濁の有無を確認し、比較対照であるリン酸水素二ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムの各水溶液によるペプチド1試料溶液と比較した。続いて各試料液から200 μLを孔径0.22 μmのフィルター、マイレクス(登録商標)－GV(商品名、日本ミリポア株式会社製)にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相HPLCにて分析し、フィルター前後のペプチド1のピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。また、HPLC測定後にpHを測定し、pH実測値とした。HPLC分析条件は実施例1記載と同じ条件にて実施した。

[0044] [表4]

各添加剤の試料溶液における濃度

溶媒	添加剤	モル濃度	重量濃度	pH
水	アルギニン	410 mM	71.4mg/mL	9
	ヒスチジン	90 mM	14mg/mL	9
	リジン	489 mM	50mg/mL	9
	リン酸水素二ナトリウム	100 mM	14mg/mL	9
	アスコルビン酸ナトリウム	401 mM	71.4mg/mL	9
	クエン酸二水素ナトリウム	243 mM	71.4mg/mL	9
	イミダゾール	1 mM	0.07mg/mL	9

[0045] (2)結果

得られた結果を表5および図2に示す。ペプチド1を溶解した結果、3種の塩基性アミノ酸であるアルギニン、リジンおよびヒスチジンのpH9における水溶液は、無色透明の外観を示し、またイミダゾールもその水溶液を用いたペプチド1の試料溶液は無色透明の外観を示した。

一方、比較対照であるアスコルビン酸ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウムの各水溶液は、ペプチド1を添加後白濁を示し、またリン酸水素二ナトリウムの水溶液は、ペプチド1を添加後、無色透明の外観を示したが、HPLC分析により算出した溶出率は53.8%という値を示し、3種の塩基性アミノ酸やイミダゾールと比較して低かった。よって、3種の塩基性アミノ酸やイミダゾールは、単にpHによる溶解性亢進の作用の他

に、ペプチド1の溶解性を高める作用を有していることが確認された。

[0046] [表5]

各種水溶液におけるペプチド1の溶液の外観、溶出率およびpH実測値

溶媒	添加剤	pH	溶出率	調製後pH	外観
水	アルギニン	9	93.8%	8.97	無色透明
	ヒスチジン	9	85.9%	9.00	無色透明
	リジン	9	89.0%	8.99	無色透明
	リン酸水素二ナトリウム	9	53.8%	8.85	無色透明
	アスコルビン酸ナトリウム	9	測定せず(*)	9.10	白濁
	クエン酸二水素ナトリウム	9	測定せず(*)	9.05	白濁
	イミダゾール	9	99.2%	9.10	無色透明

* 外観観察にて明らかな白濁が認められたため、HPLC測定を行わなかった

実施例 5

[0047] 実施例5

アルギニンによるTc99m標識促進効果

(1) 方法

実施例2で得られたpH10のアルギニン水溶液にペプチド1を溶解し、9.4 μMのペプチド／アルギニン溶液を調製した。0.01M塩酸10mLに塩化第一スズ溶液5mgを加えた溶液の25 μLをペプチド／アルギニン溶液700 μLに加え、速やかにTc-99m-過テクネチウム酸ナトリウム(以下99mTcO₄⁻)溶液0.6～1.0GBqを加え、全量を1mLとした。標識操作後のペプチド濃度は6.6 μMに希釈された。数秒間の振倒後、室温で反応させた。標識操作後10分、90分において、その一部を取り、HPLC、TLCにより各Tc-99m標識率を求めた。HPLC、TLC分析は下記の条件で実施した。

比較対照として、ジメチルスルホオキシド(DMSO)にペプチド1を溶解した後、pH10の100mMリン酸緩衝液(以下PB)で10倍に希釈し、ペプチドの終濃度を9.4 μMとしたペプチド／DMSO／PB溶液、およびPBにペプチド1を溶解し、ペプチドの終濃度を9.4 μMとしたペプチド／PB溶液をペプチド／アルギニン溶液と同様に標識を行い、HPLC、TLCにより各Tc-99m標識率を求めた。標識操作後のペプチド濃度は6.6 μMに希釈された。

HPLC条件

カラム:Cosmosil 5C₁₈-AR-300(ナカライトスク株式会社製、4.6×150mm)

溶出速度:1mL/分

検出:紫外可視吸光光度計(検出波長:220nm)

放射能検出器:STEFFI NaIシンチレーター(Raytest社製)

溶出液A:0.1%TFA/精製水

溶出液B:0.1%TFA/アセトニトリル

濃度勾配:0分(溶出液B20%)→25分(溶出液B70%)

TLC 条件

プレート:Silicagel 60F254(メルク株式会社製)

展開溶媒:28%アンモニア水/アセトニトリル=1/2

放射能検出器:Gita NaIシンチレーター(Raytest社製)

[0048] (2)結果

得られた結果のピーク面積から算出された放射化学的純度を表6に示す。410mMのアルギニン水溶液は、HPLC分析において標識後10分に放射化学的純度90%以上、標識後90分まで放射化学的純度95%以上を示した。さらにTLC分析においても標識後10分および90分では放射化学的純度85%以上を示し、加熱を必要とせずに、高いTc99m標識率と高い標識安定性が示された。

一方、比較対照であるペプチド/DMSO/PB溶液及びペプチド/PB溶液の放射化学的純度は、ペプチド/DMSO/PB溶液がHPLC分析で標識後10分:72.0%、標識後90分:75.4%、およびTLC分析で標識後10分:45.7%、標識後90分:41.9%を示し、またペプチド/PB溶液がHPLC分析で標識後10分:55.3%、およびTLC分析で標識後10分:28.0%、標識後90分:33.6%を示した。

以上の結果より、いずれの時間点においても、ペプチド/アルギニン溶液は比較対照よりも放射化学的純度が高いことが確認された。よって、アルギニン添加を伴う溶解法を用いることで、非加熱で高い標識率を達成することができ、かつ調製した標識体の安定性も向上することが示された。

[0049] [表6]

各溶媒(pH10)における放射化学的純度(%)とその経時的变化

	アルギニン		DMSO/リン酸緩衝液		リン酸緩衝液	
	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC
10分	92.5	87.2	72.0	45.7	55.3	28.0
90分	96.5	88.6	75.4	41.9	—	33.6

実施例 6

[0050] 各種アルギニン濃度におけるTc99m標識とその安定性の確認

(1) 方法

アルギニン12.5、25および50mgを秤りとり、水に溶解し、塩酸にてpH10に調整し、全量をそれぞれ700 μLにした。このときのモル濃度はそれぞれ102.5mM、205mM、410mMである。これらアルギニン水溶液にペプチド1を溶解させ、9.4 μMのペプチド／アルギニン溶液をそれぞれ調製した。0.01M塩酸10mLに塩化第一ズ溶液5mgを加えた溶液の25 μLをそれぞれのペプチド／アルギニン溶液に加え、速やかに99mTcO₄⁻溶液0.6～1.0GBqを加え、全量を1mLとした。数秒間の振倒後、室温で反応させた。標識操作後30分、90分、180分、360分、24時間、30時間において、その一部を取り、実施例5記載の条件によるTLC分析にて、放射化学的純度を求めた。

[0051] (2) 結果

ピーク面積から算出された放射化学的純度を表7に示す。標識後30時間までの全ての結果において放射化学的純度80%以上を示し、さらにアルギニン濃度が205mM以下では、標識後30時間まで放射化学的純度85%以上を示した。よって、アルギニンを使用する溶解法は、アルギニンの濃度に依存することなく、加熱を必要とせずに、高いTc99m標識率と高い標識安定性を示すTc99m標識されたペプチドを供することが可能であることが確認された。

[0052] [表7]

各種アルギニン濃度における放射化学的純度 (%) とその経時的变化

経過時間	各種アルギニン濃度における放射化学的純度 (%)		
	102.5 mM	205mM	410 mM
30分	93.3 %	92.0 %	91.6 %
90分	92.6 %	90.8 %	89.5 %
180分	92.6 %	89.7 %	87.1 %
360分	91.2 %	89.7 %	85.7 %
24時間	88.9 %	88.3 %	86.5 %
30時間	89.8 %	87.3 %	84.9 %

実施例 7

[0053] アルギニン添加により調製したTc99m-ペプチド1溶液のウサギ感染症モデルにおけるイメージング

(1) 方法

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の約10⁸個の生菌を生理食塩液1mLに懸濁させ、その内の100 μLをウサギ(ニュージーランドホワイト系、オス、体重約2kg)の右大腿部に筋肉内投与し、24時間経過後、明らかに炎症が認められたモデルウサギにペントバルビタール麻酔を施し、実施例5で得られたTc99mで標識したペプチド1(アルギニン／非加熱)の37～74MBqを耳静脈内投与し、投与後5分、1時間、2時間、3時間、4時間及び5時間にガンマカメラにてイメージを撮像した。また比較対照としてペプチド／ジメチルホルムアミド(DMF)／水により調製し加熱したTc99m標識ペプチド1(DMF／加熱)を同様に投与し検討をおこなった。比較対照の調製法は次の通りである。134mMのグルコヘプトン酸300 μLと2.6mMの塩化第一スズ溶液50 μLの混合液を含有するバイアル中に^{99m}TcO₄⁻溶液1.1～3.0GBqを加え、全量を1.35mLとした。時折転倒させることにより攪拌しながら室温で30分間反応させ、その一部を取り、セルロースアセテート膜電気泳動法にてTc-99m-グルコヘプトン酸のTc-99m標識率が95%以上であることを確認した。次に、ペプチド1を、ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し943 μMに調製し、ついで水を用いて10倍に希釈し94 μMの濃度に調製した。この溶液700 μLに、Tc-99mグルコヘプトン酸溶液300 μLを各々加え、混合攪拌し、100°Cから120°Cに加熱して10分間反応させた。標識後、その一部を取り、HPLCにより各Tc-99m標識率を求めた。HPLC

条件は以下の通りである。

HPLC条件

カラム:Puresil 5 μ m C18 (Millipore社製、4. 6 × 150mm)

溶出速度:1mL／分

検出:紫外可視吸光光度計(検出波長:220nm)

放射能検出器:STEFFI NaIシンチレーター(Raytest社製)

溶出液A:0. 1% TFA／精製水

溶出液B:0. 1%TFA／アセトニトリル

濃度勾配:0分(溶出液B20%)→25分(溶出液B70%)

[0054] (2)結果

得られた結果の代表図を、図3および図4に示す。イメージ上に关心領域を設定し、全身カウントに対する各关心領域1000画素あたりのカウントの割合(%投与量/K pixel)を求めた結果を表8および図5に示す。その結果、従来技術のTc99m-ペプチド1(DMF／加熱)および、本発明のTc99m-ペプチド1(アルギニン／非加熱)は、いずれも感染部位を明瞭に描出することができ、また両者の描出パターンは共通していた。炎症への集積は全ての時間点において本発明にかかる処方、すなわち、アルギニンを添加し非加熱条件下で調製した溶液が、従来法、すなわち、DMFを添加し100°C以上に加熱して調製した溶液よりも、上回っており、投与後1時間の1.59±0.32%投与量/K pixelから、投与後5時間では2.62±0.55%投与量/K pixelと増大した。よって、本発明である、白血球結合性化合物をアルギニンを用いて溶解し非加熱によりTc99m標識する方法は、従来技術で得られる標識体よりも炎症集積性の高い標識体を提供することができる事が確認された。

[0055] [表8]

ウサギ感染症モデルにおけるTc-99m標識ペプチド1の炎症集積(%投与量/K pixel)
(n=3、平均値±標準偏差値)

標識方法	投与後経過時間					
	5分	1時間	2時間	3時間	4時間	5時間
アルギニン／非加熱	1.74±0.22	1.59±0.32	1.77±0.25	2.01±0.29	2.32±0.56	2.62±0.55
DMF／加熱	0.95±0.24	0.91±0.14	1.09±0.22	1.52±0.27	1.76±0.39	1.84±0.27

産業上の利用可能性

[0056] 本発明に係る医療用組成物を用いることにより、水系溶媒に不溶もしくは難溶である金属標識可能なペプチドの溶解性が向上し、更に加温することなく該ペプチドを金属標識することが可能である。本発明に係る金属標識方法を用いることにより、該ペプチドに非加熱条件下で金属を標識させることが可能である。更に、本発明に係る医療用組成物における該ペプチドを金属で標識した製剤は、例えば、ペプチドとして炎症のイメージングに用いることのできるペプチドを用いた場合には、ペプチドの炎症への集積率が、従来法により調製した組成物と比較して向上するという効果も奏する。本発明により、例えば、ペプチドとして白血球結合性化合物を用いた場合には、個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行うPET画像診断、SPECT画像診断、MRI画像診断あるいは放射線治療等に有用な医療用組成物及び医療用製剤、並びにその標識方法を提供することが可能となる。

請求の範囲

- [1] 金属標識可能なペプチド及び医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物を含有することを特徴する医療用組成物。
- [2] 水系溶媒に不溶もしくは難溶である金属標識可能なペプチドを、医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物と共に水系溶媒に溶解させることにより得られる請求項1に記載の医療用組成物。
- [3] 塩基性有機化合物が塩基性アミノ酸又はイミダゾール環を有する塩基性化合物である請求項1又は2に記載の医療用組成物。
- [4] 塩基性アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン及びリジンから選択される1種以上である請求項3に記載の医療用組成物。
- [5] イミダゾール環を有する塩基性化合物が、イミダゾールである請求項3に記載の医療用組成物。
- [6] 金属標識可能なペプチドが診断薬もしくは治療用医薬品の有効成分として利用可能なペプチドである請求項1から5のいずれかに記載の医療用組成物。
- [7] 金属標識可能なペプチドがアミノ酸30残基以下又は分子量4500以下である請求項1から6のいずれかに記載の医療用組成物。
- [8] 金属標識可能なペプチドが白血球結合性化合物である請求項1から7のいずれかに記載の医療用組成物。
- [9] 金属標識可能なペプチドが、化学式(1)
(化1)
- $$Z-Y-Leu-Phe-(X)_n-Lys(NH_2)_m-\epsilon(-(R)o-(T)l-U) \quad (1)$$
- (式(1)中、
Zはアミノ基の保護基を表し;
YはMetまたはNleを表し;
(X)_nにおいて、Xは1個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、nは1または0を表し;
(NH₂)_mにおいて、NH₂はLysのα位のカルボキシル基の保護基としてのアミド基、mは1または0を表し;

ϵ (-(R)o-(T)l-U)において、RはLysの ϵ -アミノ基にアミド結合したSerまたはThr、oは1または0、Tは1個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、lは1または0、Uは金属標識可能な基を表す；

但し、XとTは同じでも異なっていてもよい)

で表される化合物である請求項1から8のいずれかに記載の医療用組成物。

[10] 化学式(1)中、Uが、金属標識可能なトリペプチド、ジペプチドメルカプトアシレート、炭素数8から20の窒素含有環状化合物、炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物、炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体及び炭素数4から10のアルキレンアミンカルボン酸から選択される金属標識可能な基である請求項9に記載の医療用組成物。

[11] 化学式(1)中、Uが-Cys-Gly-Asp、-Cys-Asp-Asp、-Cys-Asp-Gly、-Cys-Gly-Glu、-Cys-Glu-Glu、-Cys-Glu-Gly、-Cys-Gly-Asn、-Cys-Asn-Asn、-Cys-Asn-Gly、-Cys-Gly-Gln、-Cys-Gln-Gln、-Cys-Gln-Gly、-Cys-Gly-Lys、-Cys-Lys-Lys、-Cys-Lys-Gly、-Cys-Gly-Arg、-Cys-Arg-Arg、-Cys-Arg-Gly、-Asp-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Gly-メルカプトアセチル、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン(Cyclen)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン(Cyclam)、1, 4, 8, 12-テトラアザシクロペンタデカン、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン(Dioxocycam)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸(TETA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸(DOTA)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸、1, 4, 8, 10-テトラアザシクロドデカン-1-アミノエチルカルバモイルメチル-4, 7, 10-トリス[R, S]-メチル酢酸(DO3MA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10- α , α' , α'' , α''' -テトラメチル酢酸(DOTMA)、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミンペニタ酢酸(DTPA)、トリエチレンテトラミンヘキサ酢酸及びエチレングリコール-(2-アミノエチル)-N, N, N', N'-テトラ酢酸(EGTA)から選択される金属標識可能な基である請求項9又は1

Oに記載の医療用組成物。

[12] 化学式(1)中、Zがホルミル基である請求項9から11のいずれかに記載の医療用組成物。

[13] 金属標識可能なペプチドが、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-Cys-Gly-Asn)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-Cys-Gly-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys-ε(-Ser-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-ε(-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH₂)-e(-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Asp-Asp-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Gly-Asp-メルカプトアセチル)、及び

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε(-Gly-Gly-メルカプトアセチル)から選択される請求項1から12のいずれかに記載の医療用組成物。

[14] 還元剤、pH調整剤、界面活性剤、親水性有機溶媒及び安定化剤から選ばれる1種以上の添加剤を含有する請求項1から13のいずれかに記載の医療用組成物。

[15] 請求項1から14のいずれかに記載の医療用組成物を凍結乾燥することによって得られることを特徴とする凍結乾燥した医療用組成物。

[16] 請求項1から15のいずれかに記載の医療用組成物における金属標識可能なペプチドを金属で標識することにより得られることを特徴とする医療用製剤。

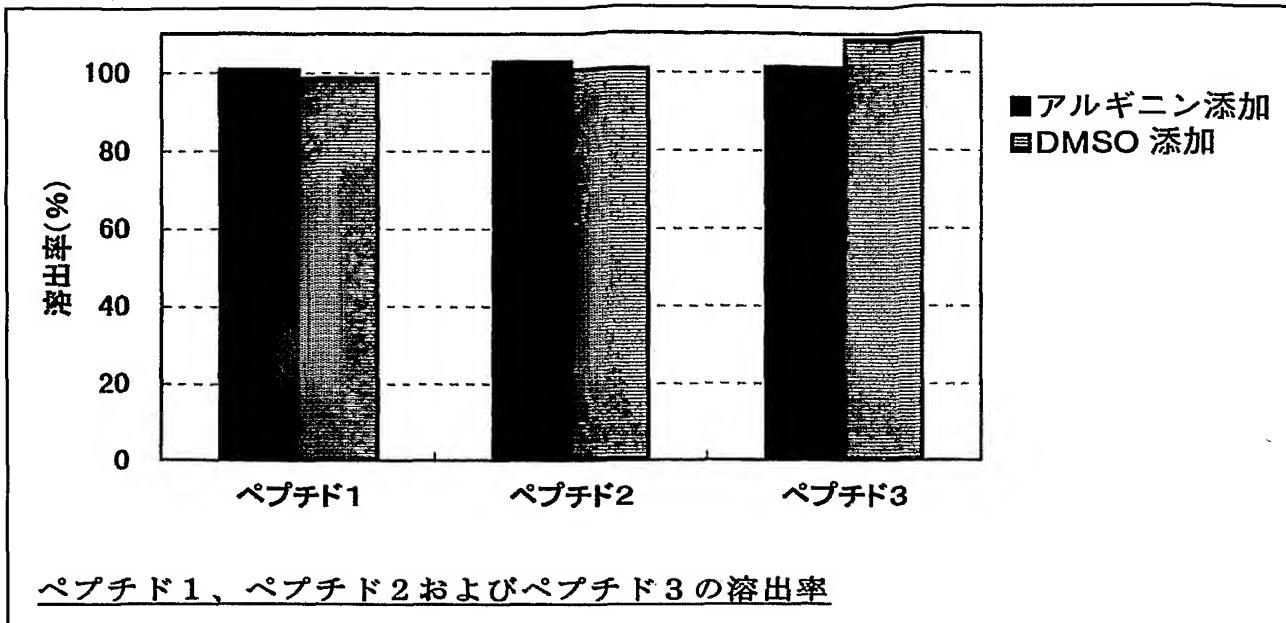
[17] 金属が、放射性金属又は常磁性金属である請求項16に記載の医療用製剤。

[18] 放射性金属がTc-99m、In-111、Ga-67、Y-90、Sn-117m、Sm-153、Re-186及びRe-188から選択される請求項17に記載の医療用製剤。

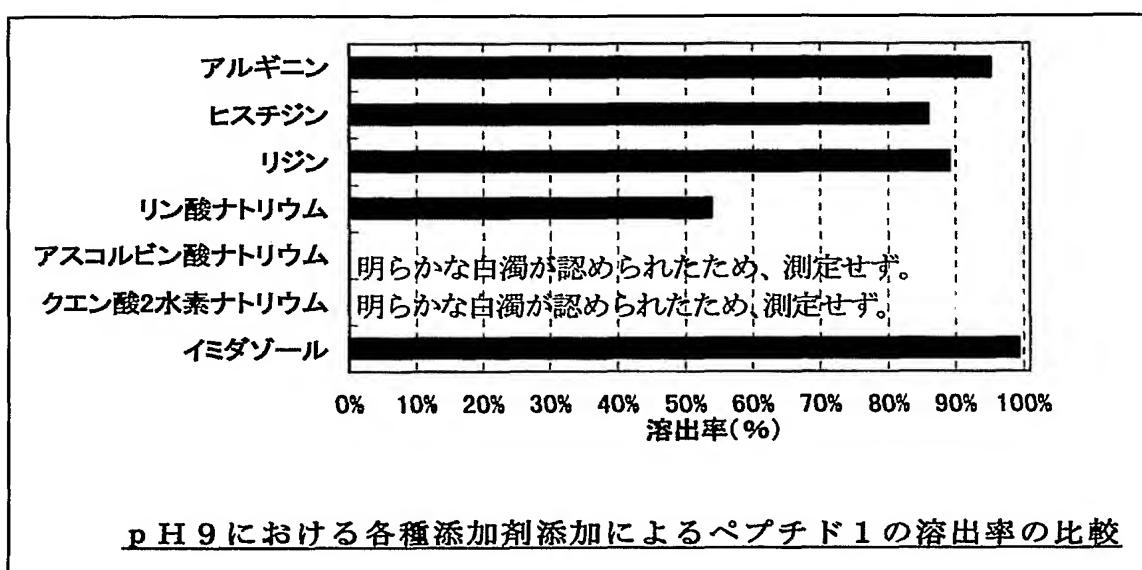
[19] 常磁性金属がGd、Fe、Mn、Cu及びDyから選択される請求項17に記載の医療用製剤。

- [20] 金属標識可能なペプチドに金属を標識する方法であって、該ペプチドを塩基性有機化合物の水系溶媒に溶解させた後、金属を標識することを特徴とする金属標識方法。
- [21] 金属標識可能なペプチドが、水系溶媒に不溶あるいは難溶なペプチドである請求項20に記載の金属標識方法。
- [22] 塩基性有機化合物が塩基性アミノ酸又はイミダゾール環を有する塩基性化合物である請求項20又は21に記載の金属標識方法。
- [23] 塩基性アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン及びリジンから選択される1種以上であることを特徴とする請求項22に記載の金属標識方法。
- [24] イミダゾール環を有する塩基性化合物が、イミダゾールである請求項22に記載の金属標識方法。
- [25] 金属が放射性金属又は常磁性金属であることを特徴とする請求項20から24のいずれかに記載の金属標識方法。
- [26] 放射性金属がTc-99m、In-111、Ga-67、Y-90、Sn-117m、Sm-153、Re-186及びRe-188から選択される請求項25に記載の金属標識方法。
- [27] 常磁性金属がGd、Fe、Mn、Cu及びDyから選択される請求項25に記載の金属標識方法。
- [28] 請求項20から27のいずれかの金属標識方法を用いることを特徴とする、金属標識されたペプチドを含有する医療用製剤の製造方法。

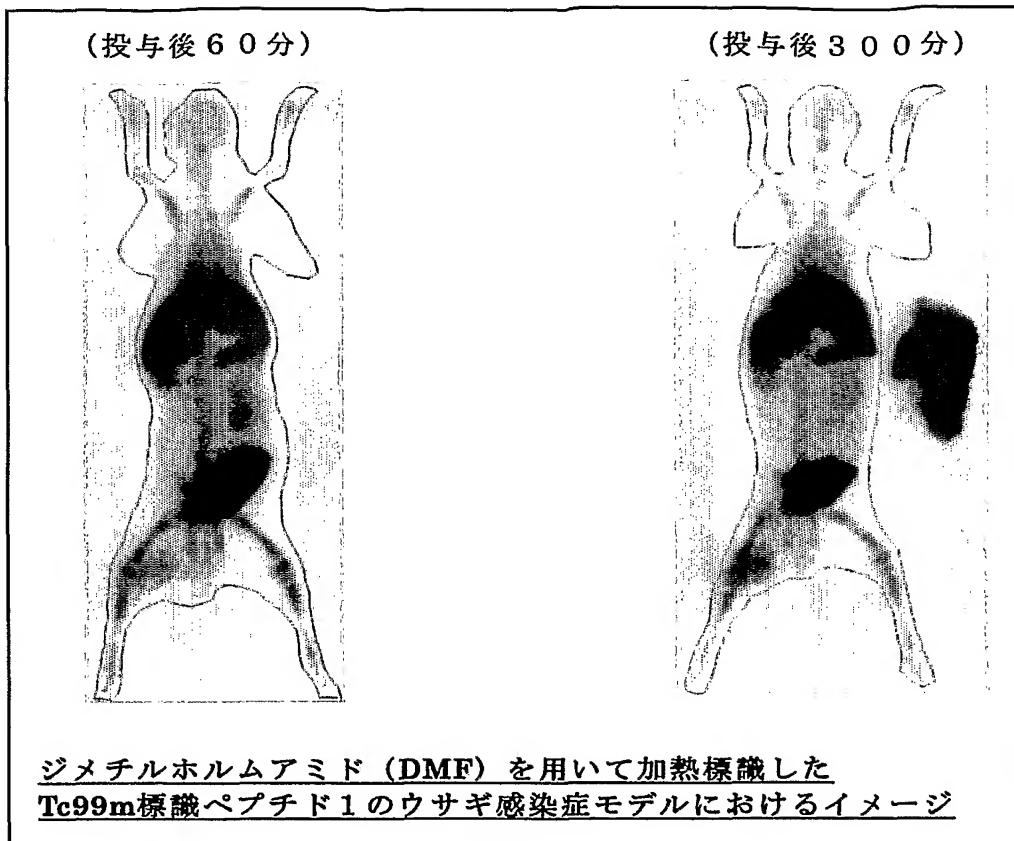
[図 1]



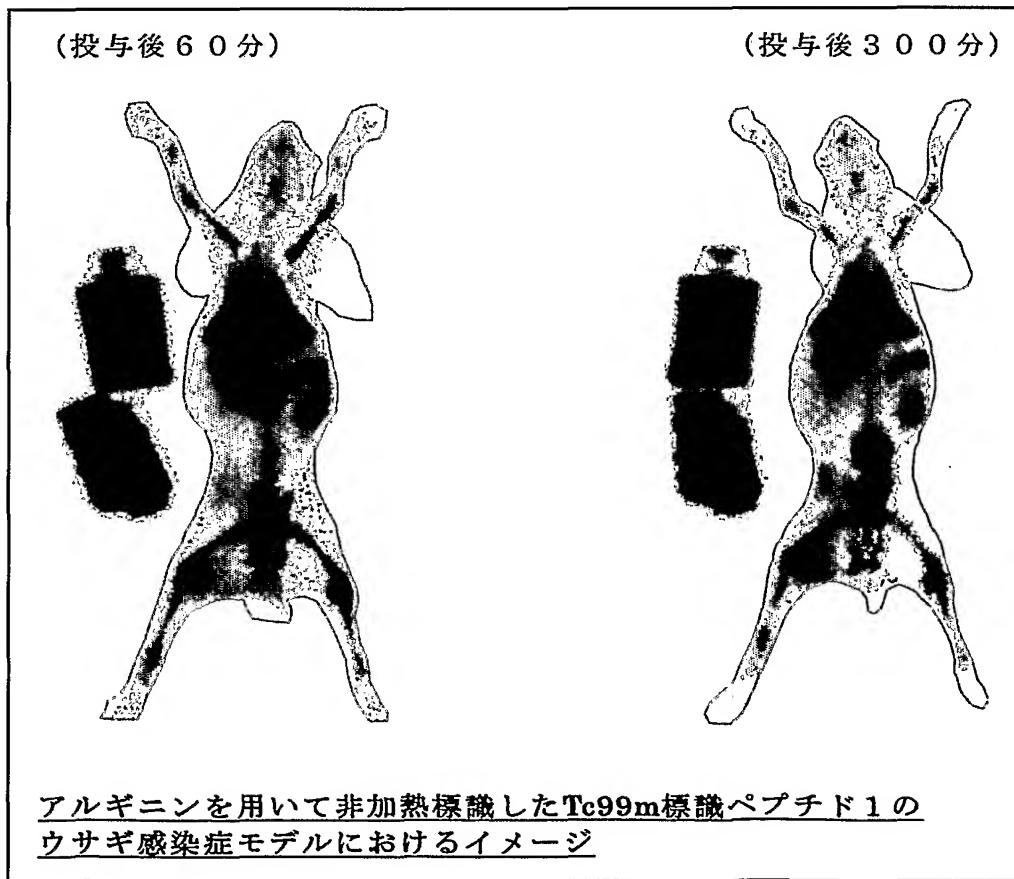
[図 2]



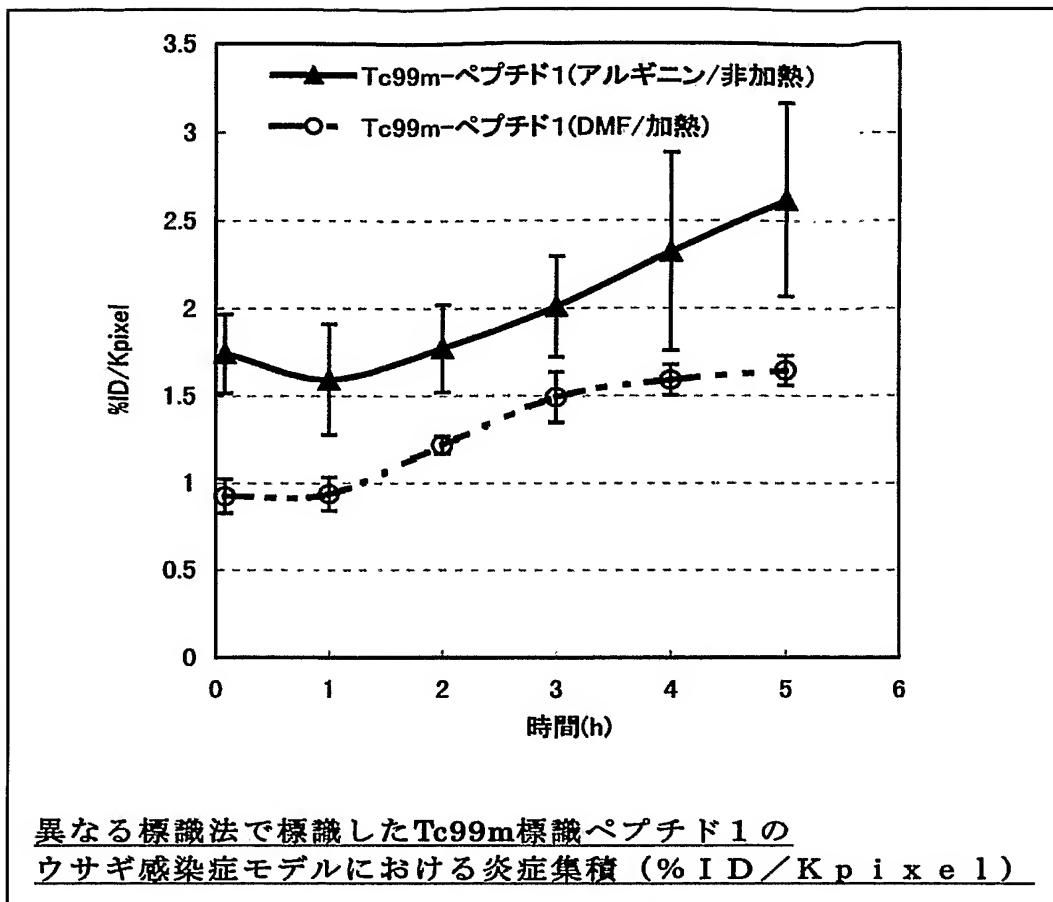
[図3]



[図4]



[図 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K51/00, 49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K51/00, 49/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BEHR, T.M. et al., Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives, Cancer research, 1995, Vol.55, No.17, p.3825-34	1-8, 14-28 9-13
A	VERBEKE, K. et al., Influence of the bifunctional chelate on the biological behavior of (99m)Tc-labeled chemotactic peptide conjugates, Nucl.Med.Biol., 2000, Vol.27, No.8, p.769-79	1-28

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 April, 2005 (11.04.05)Date of mailing of the international search report
10 May, 2005 (10.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005182

Subject of search

"A basic organic compound acceptable as a pharmaceutical additive" is described in claim 1 and a large number of compounds are involved in the scope of such compounds. However, only small part of these compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Such being the case, the search report was made concerning the part that is supported by the description and disclosed therein, i.e., the case wherein "a basic organic compound acceptable as a pharmaceutical additive" is a basic amino acid or a basic compound having an imidazole ring.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.⁷ A61K51/00, 49/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.⁷ A61K51/00, 49/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	BEHR, T. M. et al, Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives, Cancer research, 1995, Vol. 55, No. 17, p. 3825-34	1-8, 14-28 9-13
A	VERBEKE, K. et al, Influence of the bifunctional chelate on the biological behavior of (99m)Tc-labeled chemotactic peptide conjugates, Nucl. Med. Biol., 2000, Vol. 27, No. 8, p. 769-79	1-28

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

安川 聰

4C 3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

○ 調査の対象について

請求の範囲1には、「医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物」とあり、このような化合物としては、多数の化合物が包含されるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、それらのごくわずかな部分にすぎない。

よって、本調査報告は、明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち、「医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物」が、塩基性アミノ酸、又はイミダゾール環を有する塩基性化合物である場合に対して作成した。

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ 配列表 配列表に関するテーブル
- b. フォーマット 書面 コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. さらに、配列表又は配列表に関するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 换算意見：